

DOCKET NO.: 263955US0XPCT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Didier MONTARRAS, et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HEREWITH

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/FR03/02010

INTERNATIONAL FILING DATE: June 27, 2003

FOR: METHOD FOR PREPARING ANIMAL OR HUMAN ADULT STEM CELLS AND THERAPEUTIC USE THEREOF

**REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**

Commissioner for Patents
Alexandria, Virginia 22313

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NO</u>	<u>DAY/MONTH/YEAR</u>
Canada	2,391,638	28 June 2002

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. PCT/FR03/02010. Receipt of the certified copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.

Surinder Sachar

Norman F. Oblon
Attorney of Record
Registration No. 24,618
Surinder Sachar
Registration No. 34,423

Customer Number

22850

(703) 413-3000
Fax No. (703) 413-2220
(OSMMN 08/03)

27 DEC 2004



Office de la propriété
intellectuelle
du Canada

Un organisme
d'Industrie Canada

Canadian
Intellectual Property
Office

An Agency of
Industry Canada

Bureau canadien
des brevets
Certification

La présente atteste que les documents
ci-joints, dont la liste figure ci-dessous,
sont des copies authentiques des docu-
ments déposés au Bureau des brevets.

861517774

POTIFS 03 / 02010

- 6 AOUT 2003

FRO 3102010

REC'D 22 SEP 2003

WIPO PCT

Canadian Patent
Office
Certification

This is to certify that the documents
attached hereto and identified below are
true copies of the documents on file in
the Patent Office.

Mémoire descriptif et dessins, de la demande de brevet no: 2,391,638, tels que déposés, le
28 juin 2002, par INSTITUT PASTEUR, cessionnaire de Didier Montarras, Nicolas
Borenstein et Christian Pinset, ayant pour titre: "Procédé pour Maintenir la Diversité et la
Plasticité Cellulaire de Cellules Souches Adultes de Mammifère Issues de Biopsie
Tissulaire pour la Thérapie Cellulaire."

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Agent certificateur/Certifying Officer

25 juin 2003

Date

(CIPO 68)
04-09-02

Canada

OPIC CIPO

**PROCÉDÉ POUR MAINTENIR LA DIVERSITÉ ET LA PLASTICITÉ
CELLULAIRE DE CELLULES SOUCHES ADULTES DE MAMMIFÈRE ISSUES
DE BIOPSIE TISSULAIRE POUR LA THÉRAPIE CELLULAIRE**

5

DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention se rapporte au domaine de la régénération et la réparation tissulaire par transplantation cellulaire. Plus particulièrement, la présente 10 invention vise un procédé de préparation de cellules souches adultes qui préserve la diversité et la plasticité de ces cellules. La présente invention vise également l'usage de ces cellules souches obtenues par le procédé d'extraction proposé dans des applications thérapeutiques, dont la thérapie génique.

15

DESCRIPTION DE L'ART ANTÉRIEUR

Pour des raisons anatomiques et biologiques, le sang et ses dérivés ont été les premières cellules transplantées. Les greffes de cellules hématopoïétiques ont connu un chemin semblable. Depuis une vingtaine d'années, le transfert de cellules 20 neuronales foetales est étudié comme approche thérapeutique dans les pathologies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson et plus récemment dans la chorée de Huntington. Les résultats cliniques sont cohérents et montrent une nette amélioration. La limitation majeure de cette dernière approche est la source de cellules transplantées. En effet, le recours à des cellules neuronales foetales rend difficile la diffusion de ce type d'approches thérapeutiques. Les autogreffes de 25 kératinocytes constituent une solution thérapeutique dans les cas de brûlures graves. Un avantage de ce système: la capacité des kératinocytes, principales cellules de l'épiderme, à être cultivées *ex vivo*. Dans le même ordre d'idée, des cartilages défectueux ont pu être reconstruits par des chondrocytes amplifiés en 0 culture puis greffés sous arthroscopie. Des approches similaires encore très expérimentales sont aussi en cours pour des organes comme le pancréas et le foie.

Ces données, encore trop restreintes, démontrent le potentiel de la médecine régénératrice par thérapie cellulaire. Les limitations à l'extension de ces approches

sont de plusieurs natures. Pour être capable de suppléer aux défaillances d'un tissu par thérapie cellulaire il faut disposer de sources cellulaires répondant aux caractéristiques suivantes:

- les cellules doivent être facile à prélever;
- elles doivent survivre aux sites d'injection;
- elles doivent présenter une bonne capacité de prolifération et de colonisation;
- elles doivent être capable de se différencier pour obtenir un résultat fonctionnel.

Il existe donc un besoin pour de nouveaux procédés permettant d'obtenir des cellules souches aptes à être utilisées, entre autres, dans le cadre de la régénération et la réparation tissulaire par transplantation cellulaire.

SOMMAIRE DE L'INVENTION

La présente invention porte sur la mise au point d'un procédé de préparation cellulaire capable de préserver la diversité et la plasticité des cellules souches de vertébrés provenant d'une biopsie tissulaire pour leur utilisation ultérieure dans le cadre d'une régénération ou réparation tissulaire par transplantation des cellules obtenues par le procédé de l'invention à un animal, tel un être humain.

L'invention vise de plus un milieu de culture défini particulièrement utile lors de la mise en œuvre du procédé de préparation cellulaire.

La présente invention vise aussi la préparation cellulaire ou les cellules souches obtenues par le procédé de préparation de l'invention.

La présente invention vise également l'usage de ces cellules souches obtenues par le procédé de préparation proposé dans des applications thérapeutiques, dont la thérapie génique ou cellulaire.

La présente invention vise aussi une composition cellulaire comprenant des cellules souches humaines ou animales obtenues selon le procédé de préparation de l'invention.

La présente invention porte également sur un procédé de préparation de cellules souches capables de réparer ou de régénérer *in vivo* des tissus ou des organes d'un vertébré.

3.

La présente invention porte aussi sur une méthode de traitement caractérisée par l'implantation de cellules souches animales autologues ou hétérologues obtenues selon le procédé de l'invention chez un animal.

L'originalité de la présente invention porte sur le fait que, contrairement aux procédés de préparation cellulaire utilisés dans le domaine, le procédé de préparation de la présente invention permet :

- d'extraire les cellules dans des conditions définies sans protéine animale d'origine extractive, donc dans des conditions sûres du point de vue sanitaire ;
- 10 - de maintenir la viabilité cellulaire par l'utilisation de molécules anti-oxydantes et anti-apoptotiques ;
- de préserver la diversité cellulaire ;
- de maintenir le potentiel de plasticité cellulaire ;
- de maintenir le potentiel de différenciation ; et
- 15 - d'améliorer l'implantation, la colonisation et la différenciation des cellules greffées.

Par exemple, dans le procédé de préparation cellulaire décrit dans l'article de Pouzet et al. (2000, Circulation, 102 : III2210-5), il n'y a pas d'extraction selon un procédé enzymatique. Alternativement, le tissu musculaire est haché. De plus, il n'y a pas d'étape de préparation de cellules telle qu'entendue au sens de la présente invention.

La récupération fonctionnelle telle que discutée dans l'article de Pouzet et al. dépend du nombre de cellules alors que dans le procédé selon l'invention, le mode de préparation des cellules conduit avantageusement à une colonisation très importante ainsi qu'à une récupération fonctionnelle rapide de l'organe traité.

DESCRIPTION DES FIGURES

Les Figures 1, 2 et 3 sont des microphotographies illustrant la mise en évidence de cellules de muscle greffées dans le cœur de brebis. Les cellules ont été obtenues par dissociation enzymatique d'une biopsie de muscle squelettique puis directement implantées dans le myocarde de la même brebis (greffe autologue). La

présence de cellules de muscle squelettique est révélée à l'aide de l'anticorps MY32 qui reconnaît spécifiquement la myosine de muscle squelettique. La Figure 1 illustre la présence de zones de greffes massives (2 à 9 mm de diamètre) à faible agrandissement (barre d'échelle, 250 microns). La Figure 2 montre des cellules colorées par l'anticorps MY32 généralement alignées avec le réseau de cardiocytes. Ces cellules peuvent être intensément marquées ou faiblement marquées; les cardiocytes ne sont pas marqués (Barre d'échelle, 500 microns). La Figure 3 montre des cellules greffées se différenciant en fibres musculaires et formant des sarcomères organisés (Barre d'échelle, 25 microns).

10

DESCRIPTION DES MODES DE RÉALISATION PRÉFÉRÉS DE L'INVENTION

La présente invention porte donc sur la mise au point d'un procédé de préparation de cellules souches animale qui préserve la diversité et la plasticité de ces cellules provenant d'une biopsie tissulaire pour leur utilisation ultérieure dans le cadre d'une régénération ou réparation tissulaire par transplantation des cellules ainsi préparées chez un animal.

20 I) Définitions

Par « cellule souche », on entend les cellules qui ont à la fois la capacité de s'autorenouveler et la capacité de se différencier en différents types de précurseurs cellulaires.

Par « diversité des cellules souches », on entend les cellules souches qui sont classées en fonction de leur stade de développement et de leur origine tissulaire. Plus particulièrement, on entend une classification de cellules souches embryonnaires ou adultes en fonction de leur origine tissulaire, par exemple, les cellules souches de la peau ou neuronales ou du muscle.

Par « plasticité des cellules souches », on entend la capacité pour ces cellules de traverser les frontières de lignée, par exemple la capacité des cellules hématopoïétiques à se différencier en hépatocytes.

Par « régénération tissulaire », on entend la capacité à reformer un tissu soit par activation des cellules progénitrices du tissu (par exemple tissu de la peau, du foie, du cœur, de l'os ou de tissus nerveux), soit par transplantation de ces cellules progénitrices. Plus particulièrement, il s'agit alors d'une néoformation tissulaire.

5 Par « réparation tissulaire », on entend une opération qui permet de pallier un déficit sans avoir recours à un processus de régénération. La réparation tissulaire se traduit par un apport exogène de cellules qui peuvent être différentes des cellules du tissu receveur.

10 Par « transplantation cellulaire », on entend une opération qui se caractérise par un apport de cellules isolées. Cette transplantation peut être effectuée, par exemple, par injection directement dans le tissu ou dans la circulation afférente.

15 Par « animal », on entend tout organisme vivant qui peut être sujet à une transplantation cellulaire, et ceci inclut les êtres vertébrés tels que notamment les êtres humains, les animaux domestiques et sauvages, notamment les oiseaux.

ii) Procédé de préparation de cellules souches

Un premier aspect de la présente invention vise un procédé de préparation de cellules souches de mammifère. Ce procédé comprend en général, les étapes suivantes :

- 20 a) l'extraction cellulaire;
- b) la dissociation mécanique;
- c) la dissociation enzymatique; et
- d) le maintien des cellules dans un milieu spécifique permettant de préserver la diversité.

15 Plus précisément, l'extraction cellulaire est obtenue tout d'abord suite à une biopsie pour fournir un fragment tissulaire, tel un fragment de muscle, de foie ou de peau. Par exemple, une biopsie musculaire est réalisée sous anesthésie locale suite à une incision ou encore à l'aiguille. Le fragment tissulaire ainsi obtenu est ensuite humidifié dans un milieu défini, tel le DME/202 en présence de facteurs protecteurs et de facteurs inhibant la différenciation cellulaire (Pinset et Montarras), (1994) *Cell Biology : A laboratory Handbook*. Academic Press).

0 Préféablement, le milieu défini est un milieu ci-après nommé DPM (*Diversity*,

Protecting Medium) et comprend au moins:

- un milieu nutritif de base tamponné avec des tampons dépendants ou indépendants de la concentration en CO₂. Les milieux utilisés sont, dans la plupart des cas, constitués d'un mélange dans un rapport 1 :1 de milieu de type DME et de type F12. Parmi ceux-ci on peut citer en exemple le mélange DME/ F12 et DME/MCDB 202;
- un facteur protecteur, tel:
 - > des anti-oxydants (acide ascorbique, N-acétyl cystéine)
 - > des anti-caspases (Dose : environ 0.1 mU à 10 mU)
 - > des protecteurs du métabolisme (L-Carnitine)
 - > des facteurs protecteurs des métaux (Transferrine) (Dose : environ 0.1 µg/ml à 100 µg/ml)
- des hormones tels Glucocorticoïdes, insuline, acide rétinoïque, hormone thyroïdienne, minéralocorticoïdes, IGF1 ou IGF2 aux doses physiologiques allant préférentiellement de 10⁻⁶ à 10⁻⁹ M.
- des facteurs inhibant la différenciation, tels:
 - > les FGF (*Fibroblast Growth Factors*). Parmi les facteurs de la famille FGF, trois facteurs sont particulièrement importants et jouent un rôle similaire, soit FGF-2, FGF-6 et FGF-10. Chacun des facteurs de la famille FGF est employé à des concentrations allant préférentiellement de 0.1 à 100 µg/ml.
 - > l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) (Dose : environ 0.1 µg/ml à 100 µg/ml)
 - > le LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) (Dose : environ 0.1 µg/ml à 100 µg/ml) [fraction non cellulaire du sang après coagulation]
 - > le sérum est également un facteur inhibant la différenciation et peut être utilisé à une concentration variant de 0 à 100 %.

Ce milieu DPM ainsi défini est utilisé lors du procédé de préparation cellulaire.

L'absence de fluide animal dans le milieu défini, comme le sérum par exemple, permet de garantir une meilleure sécurité infectieuse contre des virus, prions, etc. et une meilleure reproductibilité du procédé de l'invention. Les prélèvements provenant de biopsies sont maintenus soit à température ambiante, soit conservés, préféablement, entre 4 et 6 °C dans le DPM pendant une période n'excédant

préférablement pas 48 heures. Il est clair que la composition précise du DPM pourra varier en fonction du type de biopsie tissulaire.

Lors de l'étape b) du procédé, le fragment tissulaire maintenu dans le milieu DPM est d'abord émincé jusqu'à l'obtention d'un homogénat cellulaire. Ceci est préférablement fait à l'aide de ciseaux chirurgicaux stériles mais tout autre outil semblable peut être utilisé. Par la suite, l'extrait tissulaire homogène ou l'homogénat tissulaire est préférablement libéré d'une partie des erythrocytes et des adipocytes grâce à une étape de lavage et de centrifugation par sédimentation douce de 1 à 10 g (Pinset et Montarras. 1994. *Cell Biology: A Laboratory Handbook*. Academic Press).

À l'étape c) du procédé, l'homogénat tissulaire obtenu à l'étape b) est soumis à une digestion enzymatique pour optimiser la dissociation cellulaire. Lors de cette étape du procédé de l'invention, des enzymes protéolytiques d'origine bactérienne, comme la collagénase et/ou la pronase, sont préférablement utilisées. Toutefois, pour des raisons de sécurité sanitaire, on peut envisager l'utilisation de trypsine produite par génie génétique ou de toute autre enzyme acceptable. Ces enzymes peuvent être utilisées seules ou en combinaison à des concentrations variant, préférablement, de 0.1 à 0.5%.

À titre d'exemple non limitatif, on peut procéder comme suit, lors de la mise en œuvre de l'étape c) du procédé :

le culot de fragments tissulaires obtenu à l'étape b) est suspendu dans du milieu DPM additionné de collagénase à une concentration finale de 0,4 g par 100 ml. La digestion enzymatique allant de 5 à 20 minutes peut être répétée plusieurs fois. La température de la réaction enzymatique se situe préférablement entre 20°C et 37°C, avec agitation externe. La digestion enzymatique a lieu préférablement en plusieurs étapes, et ce, jusqu'à cinq étapes. À chaque étape, les fragments et les cellules sont séparés par centrifugation ménagée à 10 g. Le culot de fragments est alors resuspendu dans le milieu DPM additionné d'enzymes protéolytiques puis soumis à une nouvelle étape de digestion. Les cellules présentes dans le surnageant sont récoltées par centrifugation à 200 g et resuspendues dans du milieu DPM. On aboutit ainsi à une suspension cellulaire qui additionne les cellules extraites des différentes étapes de digestion. La suspension cellulaire est ensuite filtrée sur filtre

de nylon dont le diamètre des pores est préférablement d'environ 34 microns, pour éliminer les fragments tissulaires.

Ainsi, grâce au procédé de préparation de cellules souches selon la présente invention, il est possible, par exemple, de préparer de manière sûre et reproductible, une suspension cellulaire issue d'une biopsie musculaire qui maintient son potentiel de colonisation et de plasticité cellulaire. Par exemple, pour un gramme de tissu, il est possible de préparer de 1×10^6 à 2×10^6 cellules. L'efficacité des procédés pour le maintien de la diversité et de la plasticité cellulaire est évaluée par de tests *in vivo* et de tests *ex vivo*. Dans les premiers, les suspensions cellulaires obtenues sont réintroduites dans l'animal après un marquage. À titre d'exemple une molécule fluorescente comme la Green Fluorescent Protein sera employée. Le marquage cellulaire permet de suivre le devenir des cellules injectées dans l'organisme, d'analyser leurs participations aux différents tissus et la différenciation des cellules injectées. Dans les conditions où l'on maintient la diversité et la plasticité, les cellules injectées participent à la néoformation de différents tissus comme le muscle squelettique et cardiaque, les vaisseaux, les tendons, le cartilage, l'os, le tissu hématopoïétique. Cette diversité et cette plasticité cellulaire est dépendante du site d'injection soulignant l'importance de l'environnement dans le devenir cellulaire.

Les tests *ex vivo* (en culture) permettent aussi de mesurer la diversité cellulaire et la plasticité cellulaire. Ceux-ci sont basés sur l'analyse clonale et sur la réponse à différents inducteurs de la différenciation. Parmi ceux-ci on peut citer :

- ✓ des facteurs de croissance comme l'insuline et les IGFs, les TGFs, les BMPs, le VEGF;
- ✓ des hormones comme les dérivés de l'acide rétinoïque, les hormones thyroïdiennes, les glucocorticoïdes;
- ✓ des facteurs de la matrice extracellulaire;
- ✓ des vitamines et agents permettant la minéralisation;
- ✓ les composants de la matrice extracellulaire;

L'identification cellulaire est faite par des analyses immunologiques à l'aide de coloration spécifique et d'anticorps spécifiques qui permettent à la fois l'identification et la quantification et par l'analyse transcriptomique.

Les approches complémentaires *in vivo* et *ex vivo* permettent de mesurer la

diversité et la plasticité cellulaire qualitativement et quantitativement et d'ainsi valider les conditions permettant le maintien de la diversité cellulaire et de la plasticité cellulaire.

Les cellules ainsi préparées sont une source de cellules adéquates pour la thérapie cellulaire et peuvent être soit réimplantées directement dans un organisme, soit conservées pour réimplantation ultérieure.

Le procédé de la présente invention peut comprendre une étape additionnelle, soit une étape de congélation. Cette étape optionnelle du procédé offre les avantages suivants :

- ✓ conservation des prélèvements tissulaires;
- ✓ dissociation entre la préparation de la biopsie et la réimplantation cellulaire;
- ✓ caractérisation biologique et sanitaire avant le réimplantation cellulaire.

À titre d'exemple non limitatif, on peut procéder comme suit lors de cette étape de congélation :

10⁶ à 2 x 10⁶ cellules provenant de 1 gramme de tissu sont mises en présence de milieu DPM additionné d'agents cryopréservatifs, tel le DMSO. Pour le DMSO, la concentration utilisée est préférablement de 10%. Dans ces conditions, les cellules sont maintenues à 20°C pour une période de 10 minutes puis la température est amenée lentement, en quelques heures, à moins 80°C. Finalement, les cellules sont transférées dans l'azote liquide. Il est important de noter que ces conditions de conservation ont l'avantage de ne pas modifier les caractéristiques cellulaires.

Avant de procéder à la transplantation cellulaire dans le cadre des futures applications cliniques, il peut être préférable de caractériser la suspension cellulaire obtenue par le procédé selon la présente invention. Cette caractérisation peut être entreprise au niveau protéique grâce à l'utilisation de marqueurs cellulaires tels que :

- P-Cam comme marqueur de cellule endothéliale
- N-Cam comme marqueur de cellule neuronale et musculaire
- Smooth muscle actin comme marqueurs de cellules du muscle lisse;
- GFAP comme marqueur de cellules gliales;
- Myf5, Pax3, Pax7, C-met et M-cadhérine comme marqueurs de cellules musculaires;
- Sca1+, C-Kit, CD45 et Cd34 comme marqueurs de cellules souches.

Cette caractérisation peut également être entreprise au niveau de la transcription par l'utilisation de biopuces contenant des oligonucléotides codant pour des gènes cellulaires (par exemple, facteurs de transcription spécifiques et facteurs de la machinerie du cycle cellulaire) permettant d'identifier les cellules de la suspension cellulaire.

5

iii) Utilisations thérapeutiques

Un deuxième aspect de la présente invention vise l'usage d'une suspension cellulaire ou de cellules souches obtenues par le procédé de l'invention dans des applications thérapeutiques, dont la thérapie génique, suite à une transplantation de ces cellules chez un être humain, par exemple. Plus particulièrement, la présente invention propose d'utiliser les cellules préparées par le procédé de l'invention dans le cadre d'une réparation et/ou régénération tissulaire par transplantation cellulaire. Les cellules ainsi préparées seront également utilisées comme vecteurs en thérapie génique.

15

Par exemple, les cellules souches adultes obtenues par le procédé de préparation selon l'invention peuvent servir dans le cadre d'une réparation de tissus osseux. Dans le cas présent, il s'agit de transplanter les cellules sur un site de réparation osseuse. Dans ce micro-environnement particulier, les cellules ou certaines d'entre elles peuvent adopter le phénotype osseux et ainsi participer à la 20 réparation du tissu endommagé.

20

Le procédé de préparation cellulaire de la présente invention peut également fournir une suspension de cellules souches adultes de mammifère pouvant être utilisée lors d'une restauration du potentiel hématopoïétique. En effet, la capacité 25 des cellules souches de biopsie musculaire à coloniser la moelle osseuse de souris irradiées et à contribuer à toutes les lignées hématopoïétiques, oblige à considérer le potentiel réparateur des cellules de biopsie musculaire dans le cas, par exemple, de leucémies.

30

D'autre part, il est connu que les greffes de cellules musculaires cultivées, dans le muscle sont peu efficaces et caractérisées par une mort massive des cellules réimplantées dans les heures qui suivent leur injection. Il est par conséquent proposé que le procédé de préparation de cellules souches selon l'invention peut

contribuer à la réparation du tissu musculaire. Les cellules contenues dans la suspension pourront répondre aux micro-environnements et ainsi restaurer des fonctions ou réparer le tissu musculaire.

5

EXEMPLE

L'exemple qui suit sert à illustrer l'étendue de l'utilisation de la présente invention et non à limiter sa portée. Des modifications et variations peuvent y être effectuées sans que l'on échappe à l'esprit et à la portée de l'invention. Bien que l'on puisse utiliser d'autres méthodes ou produits équivalents à ceux que l'on retrouve ci-dessous pour tester ou réaliser la présente invention, le matériel et les méthodes préférés sont décrits.

Exemple 1 : Réparation du tissu cardiaque

15

Introduction

A la différence du muscle squelettique, le tissu cardiaque ne possède pas à l'état adulte de cellule souche capable de réparer ce tissu après une lésion. De ce fait, l'ischémie cardiaque est toujours accompagnée d'une insuffisance de contraction qui si importante conduit à l'insuffisance cardiaque. L'objectif de la thérapie cellulaire dans cette indication est de restaurer la fonction de contraction. Des expériences dans ce sens ont été conduites chez l'Homme avec comme source de cellules, des cellules musculaires amplifiées en culture. Cette première démarche montre la faisabilité de l'approche, mais aussi, certaines limitations de la stratégie adoptée. L'amplification d'un grand nombre de cellules musculaires dans des milieux comprenant des fluides animaux tel le sérum de veau foetal, et leur transplantation dans un tissu hétérotypique sont des opérations à la fois lourdes et non sans danger sanitaire potentiel (contaminants vitaux, prions, etc.). La limitation essentielle de ce procédé réside dans le fait que les cellules ainsi injectées ont une plasticité restreinte qui ne donnent que des cellules musculaires squelettiques. Le procédé de préparation de cellules souches de la présente invention évite l'appauvrissement de la diversité cellulaire par la culture.

Description de la transplantation cardiaque chez la brebis

Protocole anesthésique : prémédication avec du midazolam, induction à l'aide d'éтомidate, intubation trachéale et ventilation à pression positive avec de l'isoflurane dans 100% d'oxygène. La surveillance est assurée par électrocardioscopie, pression artérielle invasive, capnographie. Analgésie postopératoire avec de la bupivacaine (bloc intercostal lors de thoracotomie), morphine et de la flunixin méglumine.

Biopsie du muscle squelettique : Une biopsie du muscle squelettique (approximativement 10 g) est explantée stérilement à partir des biceps fémoraux gauches de chaque brebis. Le tissu ainsi prélevé est maintenu dans du DMEM (SIGMA) à température de la pièce jusqu'à digestion mécanique ou enzymatique.

La plaie de l'animal est refermée de la façon habituelle. Les animaux récupèrent pendant environ trois heures, puis sont ré-anesthésiés lorsque les cellules sont prêtes à être réimplantées.

Extraction des cellules musculaires : Les explants de muscle squelettique sont pesés puis lavés dans du DMEM. Le tissu adipeux et *fascia* sont retirés et le muscle est émincé aux ciseaux jusqu'à l'obtention d'un homogenat tissulaire. Les fragments de muscle sont ensuite sédimenstés dans du DMEM à 300 rpm pendant 2 minutes puis débarrassés du surnageant.

Afin de libérer les cellules satellites, les fragments de muscle sont incubés à 37°C avec agitation dans 10 mL de DMEM additionnée de 0,4% (P/V) de collagénase (Type IA, SIGMA) brute. Après 20 minutes les fragments sont centrifugés à 300 rpm pendant 2 minutes.

Le surnageant contenant les cellules isolées est conservé dans du DMEM à 20 % (V/V) de serum de veau fœtal. Le culot subit jusqu'à quatre digestions supplémentaires (Pinset, C. et Montarras, D. Cell Systems for Ex-vivo Studies of Myogenesis : A Protocol for the Isolation of Stable muscle cell populations from newborn to adult mice dans *Cell Biology : A Laboratory Handbook* ; deuxième édition

e. J. F. Celis, Academic Press; 1998).

Les cellules extraites sont ensuite filtrées sur un filtre de nylon avec pores de 250 µm de diamètre (Polylabo SA).

5 **Marquage des cellules** : Afin de marquer leurs noyaux, les cellules sont resuspendues dans 10 mL de DMEM sans sérum contenant 25 µg/mL de 4'-6-diamino-2-phénylindole (DAPI, SIGMA) pendant 10 minutes. Les cellules sont rincées quatre fois dans du DMEM afin d'enlever le DAPI. Les cellules mononucléées sont dénombrées avec une cellule de numération sous microscopie à fluorescence. La préparation cellulaire est ensuite resuspendue dans 1.2 mL de DMEM sans sérum et conservée à 4°C jusqu'à l'implantation.

10 **Greffé cellulaire** : Les brebis préalablement anesthésiées selon la méthode décrite ci-dessus sont placées en décubitus latéral droit pour une thoracotomie gauche sur le 5ème espace intercostal. Après péricardiotomie et suspension du péricarde, les cellules dans du DMEM sont injectées (0.1 mL par site), à l'aide d'une seringue à insuline connectée à un épijet 27 G, sur 10 zones du ventricule gauche. Une cartographie des vaisseaux coronaires est établie pour repérer les sites d'injection dans le myocarde. Des points de sutures épicardiques de repérage sont réalisés pour au moins deux injections. Le thorax est refermé de la manière habituelle et les animaux récupèrent sous régime analgésique (morphine à 0.5 mg/kg IM BID, flunixin 1 mg/kg IM une fois) jusqu'au lendemain inclusivement.

15 **Cultures cellulaires témoins** : Afin de confirmer la présence de cellules précurseurs du muscle dans la préparation cellulaire, un échantillon de 100 µL de la suspension cellulaire est ensemencé dans une boîte de culture contenant du DMEM avec sérum de veau fœtal. Les cellules sont maintenues à titre de témoin dans une atmosphère à 5% de CO₂. Trois à sept jours suivant l'ensemencement, les cellules servent à une immunodétection du facteur de régulation spécifique MyoD (DAKO) telle que décrite par Montarras, D. et al. (Cultured Myf5 Null and MyoD Null Muscle Precursor Cells Display Distinct Growth Defects. Biol Cell 2000;92 :565-72).

Résultats

La procédure d'injection cellulaire n'a pas d'effet sérieux sur les animaux. Une arythmie ventriculaire survient lors de l'insertion de l'aiguille et lors de l'injection des cellules mais se résorbe lorsque l'aiguille est retirée. Le dénombrement des cellules permet de déterminer l'injection de $1.7 +/- 0.3 \times 10^7$ cellules mononucléées marquées au DAPI.

L'expression de la chaîne lourde de la myosine squelettique (MY32) est détectée à 3 semaines post-implantation dans 8 animaux sur 8, ce qui confirme la survie cellulaire et l'expression myogénique des cellules implantées. De larges surfaces de greffon (de 2 à 9 mm de diamètre) ou de discrets foyers sont observés à l'intérieur de la paroi du myocarde (Figure 1). Des cellules isolées sont aussi observées dans le tissu adipeux du péricarde. À l'intérieur de la paroi du myocarde, les fibres positives pour l'expression de MY32 sont généralement alignées avec des cardiocytes natifs. Certaines de ces fibres sont fortement marquées à l'anticorps dirigé contre MY32, alors que d'autres ne sont que faiblement marquées (Figure 2). Ces fibres ne sont pas couplées électro-mécaniquement entre elles ou avec les cardiocytes natifs tel que démontré par immunohistochimie négative à la connexine-43.

Les cellules implantées développent des sarcomères organisés et présentent soit une morphologie allongée caractéristique de myotubes multinucléés fusionnés, soit une morphologie qui demeure mononucléée (Figure 3). Ces cellules du muscle squelettique possèdent des noyaux observés en périphérie ou au centre. Une fibrose de remplacement et des régions présentant des cellules mononucléées de la réponse inflammatoire sont aussi observées.

Aucun marquage au DAPI n'est observé dans les coeurs explantés. Ceci peut être dû à une division cellulaire active entraînant une dilution du DAPI. En effet, dans les cultures cellulaires servant de témoins, le DAPI devient indétectable après 6 à 8 doublements de population cellulaire.

Les boîtes de culture servant de témoins sont observées quotidiennement. L'immunodétection du facteur de régulation spécifique du muscle squelettique MyoD montrent qu'approximativement 50% des cellules en culture sont des cellules précurseurs du muscle squelettique. Quand on permet aux cellules de fusionner,

toutes les cellules montrent de nombreux myotubes une semaine suivant l'ensemencement.

Bien que des modes de réalisation préférés de l'invention aient été décrits en détails ci-dessus et illustrés dans les dessins annexés, l'invention n'est pas limitée à ces seuls modes de réalisation et plusieurs changements et modifications peuvent y être effectués par une personne du métier sans sortir du cadre ou de l'esprit de l'invention.

REVENDICATIONS

1. Procédé de préparation cellulaire capable de préserver la diversité et la plasticité des cellules souches de vertébrés.
- 5
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
 - l'extraction cellulaire
 - la dissociation mécanique
 - 10 - la dissociation enzymatique
 - le maintien de cellules obtenues dans un milieu spécifique permettant de préserver la diversité et la plasticité.
- 15
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il est constitué d'un milieu de culture spécifique comprenant au moins :
 - a) un milieu nutritif;
 - b) un facteur protecteur;
 - c) des hormones;
 - d) des facteurs inhibant la différentiation.
- 20
4. Procédé de préparation cellulaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 dans lequel les cellules souches sont des cellules souches animales choisies dans le groupe constitué par des cellules souches progénitrices des différents tissus tels que la peau, le foie, le cœur, l'os ou les tissus nerveux.
- 25
5. Procédé de préparation de cellules souches capables de réparer ou de régénérer *in vivo* des tissus ou des organes d'un vertébré.
- 30
6. Utilisation des cellules souches humaines ou animales obtenues selon le procédé de l'une quelconque des revendications 1 à 5 pour permettre le traitement de maladies par thérapie cellulaire ou thérapie génique.

7. Méthode de traitement comprenant une étape d'implantation de cellules souches animales autologues ou hétérologues obtenues selon le procédé de l'une quelconque des revendications 1 à 5 chez un animal.
- 5 8. Composition cellulaire comprenant des cellules souches humaines ou animales obtenues selon le procédé de l'une quelconque des revendications 1 à 5.
- 0 9. Composition selon la revendication 8, caractérisée en ce que les cellule souches ont une capacité de colonisation et une capacité à permettre une récupération fonctionnelle.

Figure 1

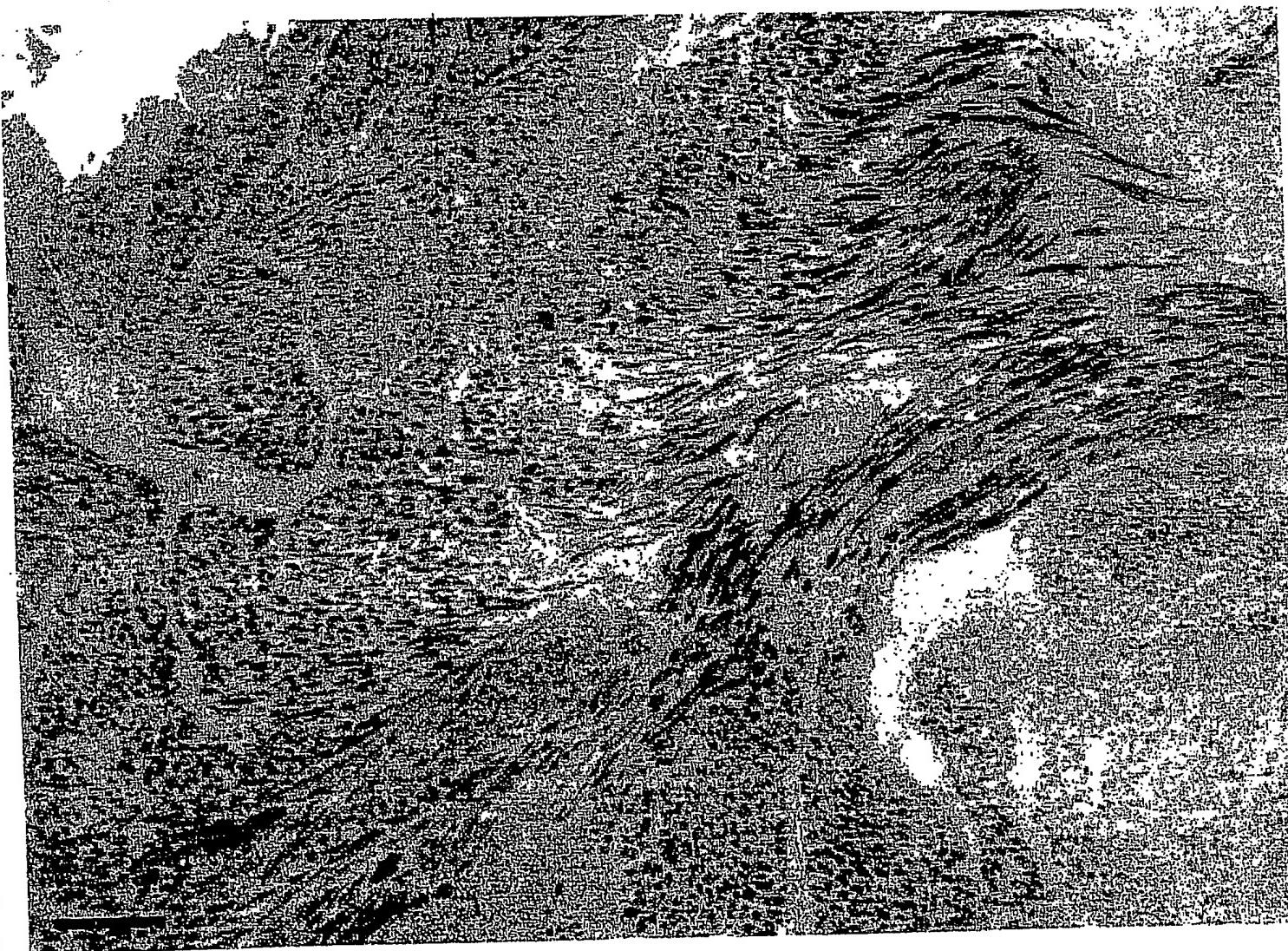
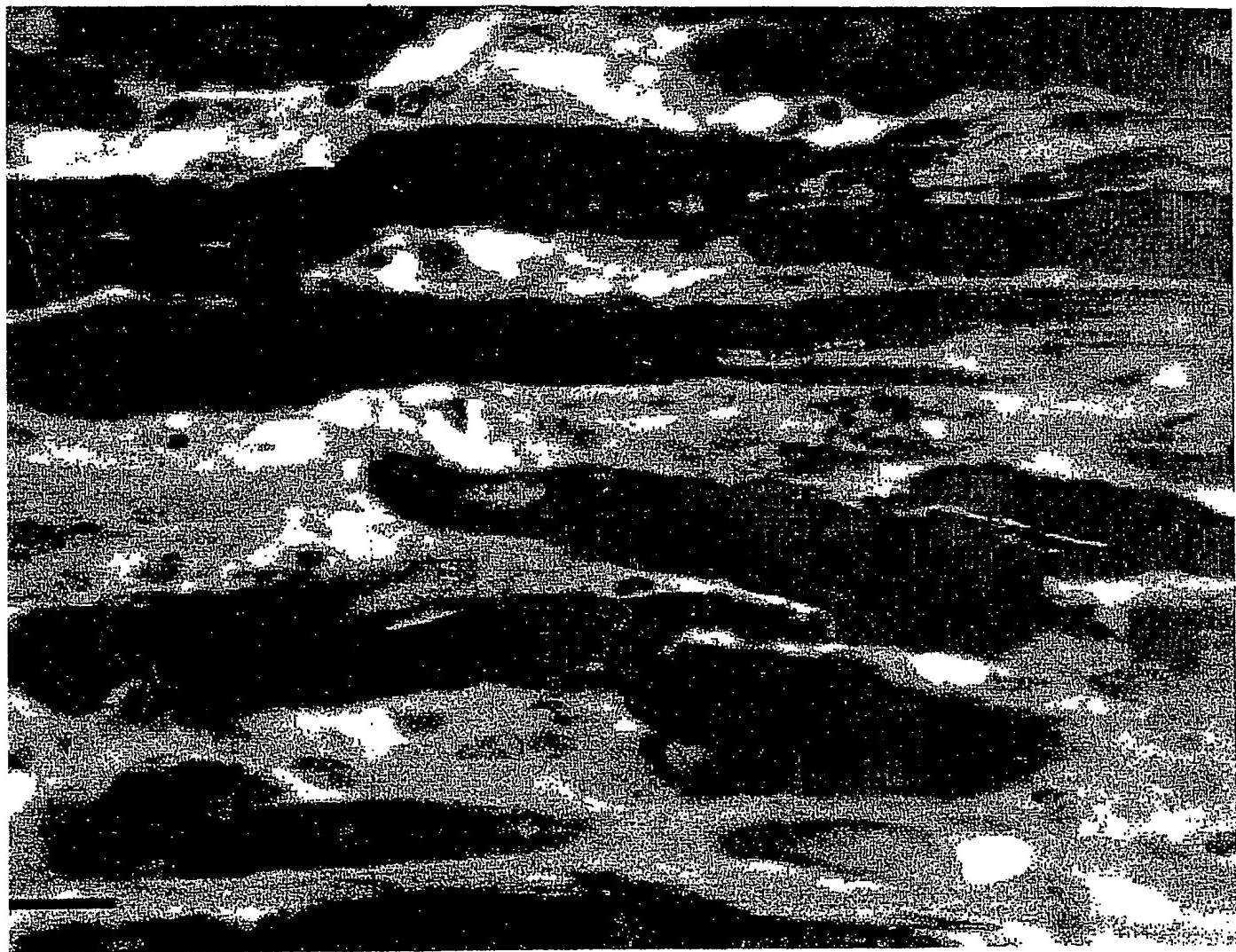


Figure 2



Figure 3



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.